65—73 果蝇；线粒体；DNA；多态性；物理图谱

维普资讯 http://www.cqvip.com

动 物 学 研 究 1995, 16 (1): 65—73　　CN 53-1040／Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research

中国大陆若干群体的黑果蝇的线粒体 DNA 多态性研究*

贾振宇[1]　朱定良　庚镇城　　　青塚正志
(复旦大学遗传所　上海　200433)　　(日本东京都立大学生物系)

Q969.462.2

A

摘要　本文研究了果蝇 *D. virilis* 种群 *D. virilis* 线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的多态性。用 9 种限制性内切酶 *Xba* Ⅰ，*Eco*RⅠ，*Pst* Ⅰ，*Hind* Ⅲ，*Bgl* Ⅱ，*Sac* Ⅰ，*Sca* Ⅰ，*Eco*RⅤ和 *Puv*Ⅱ，对青岛、南京、上海、宁波与泉州 5 个 *D. virilis* 群体的 mtDNA 进行了限制性片段长度多态性(restriction fragments length polymorphism, RFLP)的研究。在 5 群体中，发现 5 种不同的酶切图谱，它们彼此之间的遗传差异 π 为 0.46%—1.76%，群体内遗传差异 π_{ij} 为 0.00%—0.33%，群体间的差异 d_{xy} 为 0.00%—0.82%。分布于中国大陆的 *D. virilis* 的群体间遗传差异在总遗传差异中所占比例 γ_{π} 值为 24.62%。我们发现，*D. virilis* 的栖息环境对 mtDNA 的遗传变异有十分明显的影响，而不同地理纬度的群体之间其遗传距离并无倾群(cline)表现。

关键词　*D. virilis* 群体，线粒体DNA(mtDNA)，限制性内切酶，物理图谱，多态性

多细胞动物线粒体 DNA(mtDNA)在分子进化研究中有许多独特的优越性(Nei, 1983)。首先，mtDNA 容易提取，是一种便利的实验材料。其次，动物的 mtDNA 基因组小，约为 10700—19500 bp，是多细胞动物最小核基因组的 1／25000(核基因组的大小一般为 4×10^{8}—4×10^{11} bp)。再次，线粒体基因组不含基因间隔区(spacer)与内含子(intron)，无重复序列，无不等交换，无基因重组、倒位、易位等畸变，也无核基因组中那种功能不清、令人困惑的片段。最后 mtDNA 系母系遗传，不存在双亲遗传的遗传差异。因此，相对核 DNA 来说，mtDNA 进化似乎沿着一条较为简捷的途径发展。学者们认为 mtDNA 是研究分子进化的有价值的模型。

根据对一些哺乳动物物种 mtDNA 比较研究的推测(Nei, 1983)，在原始物种分化的前 0.15 亿年(1.5×10^{7} 年)内 mtDNA 序列的变异速率大约为核 DNA 的 10 倍；当物种分化时间超过 0.25 亿年(2.5×10^{7} 年)后，mtDNA 序列变异速率与单拷贝的核 DNA 相同或更小。这一说法提示，研究近缘种或种内进化，mtDNA 将比核 DNA 提供更多、更明显的数据。木村资生(Kimura, 1983)认为，发生于 mtDNA 的无义突变速率 (3.82×10^{-7}／年) 是核 DNA 的无义突变率(5.5×10^{-8}／年)的 7 倍。

---

* 中国自然科学基金会资助

[1] 现在浙江省医学科学院(310013)

本文 1994 年 1 月 3 日收到，同年 6 月 21 日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

Nei 和 Li(1979)建立的"利用限制性内切酶研究遗传变异的数学模型"，为研究 mtDNA 分子进化提供了便利的方法。分子进化学学者可利用它在研究 mtDNA 的 RFLP 之后推算出 mtDNA 核苷酸的差异。学者们利用 Nei 和 Li 的模型，已对人、鼠、羊、果蝇、蟹等动物的 mtDNA 的多态性进行了研究(Ferris, 1983; Nei, 1982, 1983)，从中发现很多有价值的结果。

果蝇是遗传学研究的经典材料。Shah 等(1979)首先研究了果蝇 mtDNA 的种间、种内差异。他们用 4 种限制性内切酶 *Hap*Ⅱ、*Hae*Ⅱ、*Hind*Ⅲ和 *Eco*RⅠ比较研究了果蝇 *D. virilis*, *D. melanogaster*, *D. simulans* 的酶切图谱，发现了在种间、种内均存在遗传差异，但缺乏明确的讨论。Solignac 等(1986)研究了 *D. melanogaster* species subgroup 中的 8 个种的 mtDNA，根据核苷酸差异得到的遗传距离，绘出了 *D. melanogaster* subgroup 的进化系统树。此项工作对于我们研究 *D. virilis* 的 mtDNA 的进化具有借鉴意义。

果蝇 *D. virilis* 属 *D.virilis* 种群中的一个种，是主要分布于亚洲的一个古老种。*D. virilis* 体黑色，个体肥大，体长约 3 mm，体重 1.6—2.0 mg；染色体 6 对，其中常染色体 5 对，性染色体 1 对；具家栖性。Throckmorton(1983)，H. Watabe 和 Higuchi 等人(实验室交流)认为 *D. virilis* 起源于东亚。中国大陆，尤其是西南云贵高原很可能是 *D. virilis* 的起源地。中国大陆的 *D. virilis* 群体的多态性，迄今国内外学者还未进行研究。所以，这项研究具有开拓性质。我们研究了广布中国大陆的 5 个群体的 mtDNA 的遗传差异，从 mtDNA 多态性方面探讨了 *D. virilis* 的进化问题。

1 材料和方法

1.1 果蝇的采集

实验所用果蝇 *D. virilis* 采自青岛、南京、上海、宁波、泉州的酿醋厂及南京的酱油厂。经日本果蝇分类学专家 H. Watabe 和 M. T. Toda 等鉴定，确系 *D. virilis* species group 中的 *D. virilis*。

表 1 *D. virilis* 群体的简称地理位置采集地

Tab. 1 Abbreviations, Geographic sites and collecting sites of *D. virilis* populations

	地点及简称					
位 置	青岛 QD	南京 NJ	南京* NJ	上海 SH	宁波 NB	泉州 QZ
经度(东经)	120.3°	118.8°	118.8°	121.5°	122.0°	118.6°
纬度(北纬)	36.1°	32.1°	32.1°	31.2°	30.0°	24.9°
采集地	醋厂	醋厂	酱油厂	醋厂	醋厂	醋厂

南京*：将从南京酱油厂采集到的 *D. virilis* 与从南京醋厂采集到的 *D. virilis* 分为两个群体，以便研究 *D. virilis* 栖息环境对 mtDNA 变异有无影响。

1.2 单雌系(isofemale line)的建立

将每一地方群体采集到的雌性个体分别饲养于含培养基的指管中，由每一雌蝇繁衍出的后代为一个单雌系。

1.3 线粒体的提取

取羽化 2—3 天的 *D. virilis* 成虫，匀浆后提取线粒体，采用 SDS 破线粒体膜、异丙

维普资讯 http://www.cqvip.com

醇沉淀法提取线粒体 DNA(mtDNA)。

1.4 酶切、电泳

酶切反应体积 10 μl(9 μl mtDNA+1 μl 酶切反应缓冲液)；

酶量：4—5 单位／反应管；

酶解条件：37℃水浴 2 h 以上；

终止反应：0℃下放置 5 min，加 2 μl 电泳前沿指示剂；

电泳检验：0.7%琼脂糖凝胶(含 0.5 μg／ml 溴化乙锭)，TPE(0.08 M Tris-phosphate，0.008 M EDTA) 电泳缓冲液。前沿指示剂：0.2%溴酚兰，50%蔗糖；

电泳条件：恒压 60 V，2.5—3 h；

电泳结果摄影：将凝胶置于紫外波长为 242 nm 的倒置紫外灯下拍照。

1.5 数据处理

Nei 等(1979)在“利用限制性内切酶研究遗传差异的数学模型”中指出：不同 DNA 序列相近程度越大，其限制性内切酶酶切位点的位置、数目越相似。因此，用酶切位点的差异可以估算同源 DNA 的核苷酸差异。

对于环状 DNA：$a=(g/2)^{r1}[(1-g)/2]^{r2}$，其中 r1，r2：限制性内切酶识别顺序中 G+C 与 A+T 的碱基对数，r = r1+r2，g：DNA 中 G+C 的百分含量，a：限制性内切酶在 DNA 上的识别位点数。

A：不同 DNA 的核苷酸差异（不同酶切图谱的 mtDNA 之间的核苷酸差异）$\pi=-(\ln\bar{S})/r$　　$\bar{S}=2n_{xy}/(n_x+n_y)$ (限制性内切酶在 DNA x，y 上的识别位点数为 n_x，n_y，x，y 共同具有的位点数为 n_{xy})。

B：群体内核苷酸差异

$$\pi_{ij}=\frac{\eta}{\eta-1}\sum_{ij}X_iX_j\ \pi_{ij}=\frac{\eta}{\eta-1}\sum_{ij}P_iP_j\quad\pi_{ij}\left(1-\frac{1}{\eta}\right)$$

其中 η：群体的大小；X_i，X_j：某一酶切图谱的 mtDNA 在群体中的预期比值；P_i，P_j：某一酶切图谱的 mtDNA 在群体中的实际所测比值；

C：群体间的核苷酸差异

$$\pi_{xy}=\sum_{ij}P_iP_j\ \pi_{ij}$$

净群体间核苷酸差异(不含群体内差异)

$$d_{xy}=\pi_{xy}\ -(\pi_x+\pi_y)/2$$

D：研究的种的所有群体的核苷酸差异

所有群体差异：$\pi_T=\sum_{ki}X_k\ X_i\ \pi_{ki}$

其中 X_k，X_i 为第 k，i 的酶切图谱在所有群体中的平均比值。

所有群体的群体内平均差异：

$$\pi_s=\sum_{i=1}^{s}W_i\pi_i\ \ /\sum_{i=1}^{s}W_i$$

其中 W_i 为第 i 群体的大小

群体间差异：$\delta_{ST}=\pi_T-\pi_S$

群体间差异在总差异中的比例：$\gamma_{ST}=\delta_{ST}/\pi_T$

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 结果

本文利用9种限制性内切酶 *Xba* I、*Eco*R I、*Pst* I、*Hind* Ⅲ、*Bgl* Ⅱ、*Sac* I、*Sca* I、*Eco*RV与 *Puv* Ⅱ对 *D. virilis* 的5个地方群体：青岛(QD)、南京(NJ、NJ*)、上海(SH)、宁波(NB)、泉州(QZ)进行了酶切，得到了酶切图谱。

在所研究的各群体的单雌系 mtDNA 中，mtDNA 在大小上没有差异，均为16.0 kb。

但是5个群体单雌系的mtDNA酶切图谱有5种类型：A、B、C、D、E，如示意图1。(*Drosophila* 酶切图谱、国际上均以 *Xba* I 切点为开端、绘出其它限制性内切酶位点)。

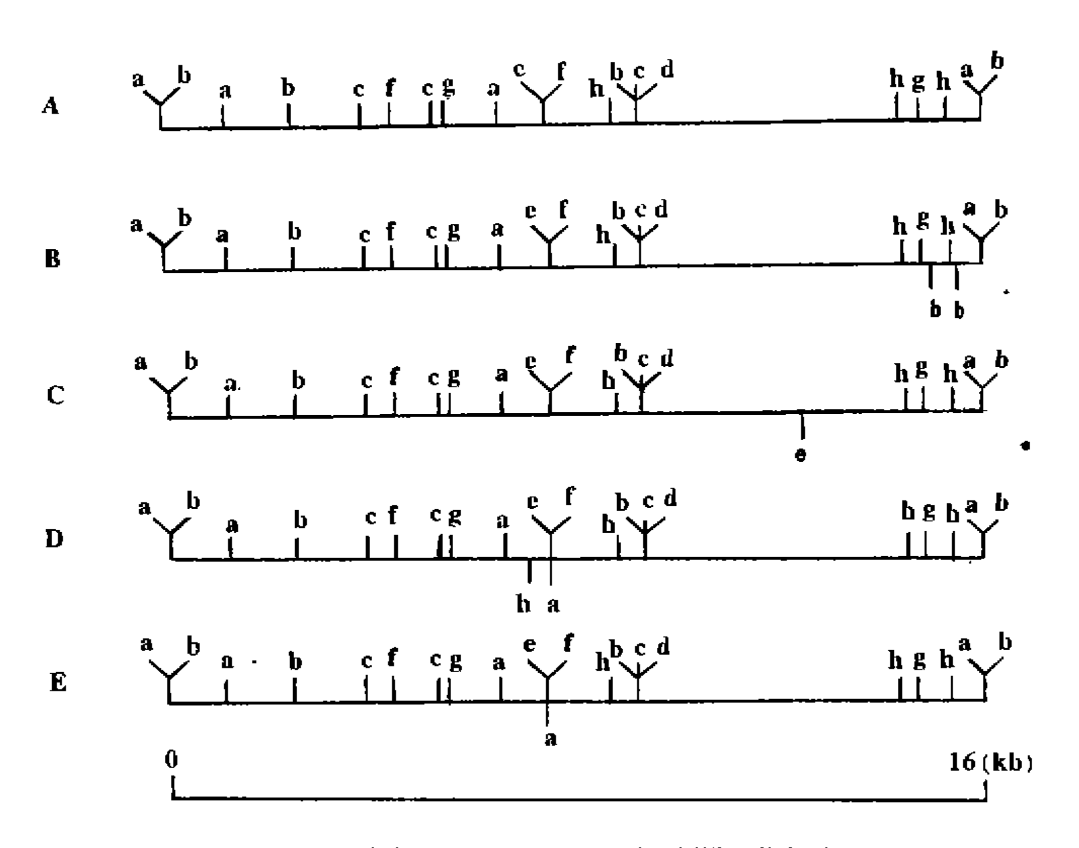


图1 果蝇 *D.virilis* mtDNA 酶切图谱5种类型

Fig. 1 Five types of restriction map of mtDNA found in *D. virilis*

a: *Xba* I, b: *Hind*Ⅲ, c: *Pvu*Ⅱ, d: *Pst* I, e: *Bgl* I, f: *Sac* I, g: *Sca* I, h: *Eco*R I, i*: *Eco*RV.

(* A、B、C、D、E 5种酶切图谱上均未发现有 *Eco*RV的位点)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2　5 种酶切图谱的 mtDNA 在各群体中出现的频率

Tab. 2　Frequencies of five genotypes of mtDNA in populations

群体	酶切图谱					
	A	B	C	D	E	*n*
QD	0.2	0.2	0.6			5
NJ	1.0					5
NJ*				0.5	0.5	2
SH	0.8	0.2				5
NB	1.0					5
QZ	0.8	0.2				5
$\sum n$						27

群体按地理纬度排列、*n*：所研究的单雌系数。

表 3　不同酶切图谱的 mtDNA 之间的遗传差异

Tab. 3　Genetic difference in five genotypes of mtDNA

	A	B	C	D	E
A		0.9474	0.9730	0.9474	0.9730
B	0.009006		0.9231	0.9000	0.9231
C	0.004562	0.01334		0.9231	0.9474
D	0.009006	0.01756	0.01334		0.9231
E	0.004562	0.01334	0.009006	0.01334	

对角线右上方为 S 值，左下方为 π_n 值。

表 4　*D. virilis* 群体内差异(π)，群体间差异(π_{xy} 与 d_{xy})

Tab. 4　Inter-and Intra-populational variation of *D. virilis*: π、π_{xy} and d_{xy}　($\times 10^{-3}$)

	QD	NJ	SH	NB	QZ	NJ*
QD	2.508	4.538	5.592	4.538	5.592	11.115
NJ	3.284	0	1.801	0	1.801	6.784
SH	3.168	1.081	1.441	1.801	3.602	4.058
NB	3.284	0	1.081	0	1.801	6.784
QZ	3.618	1.081	2.161	1.081	1.441	4.058
NJ*	8.229	5.109	1.670	5.117	1.670	3.335

对角线方格内为 π，右上方为 π_{xy}，左下方为 d_{xy}

表 5　*D. virilis* 在中国大陆各群体的 π_T、π_S 及 γ_{ST}

Tab. 5　π_T、π_S and γ_{ST} of *D. virilis* populations contributing in Chinese Continent

π_T	π_S	δ_{ST}	γ_{ST} (%)
0.001430	0.001078	0.000352	24.62

π_T、π_S 及 γ_{ST} 分别为 *D. virilis* 在中国大陆各群体(不含 NJ* 群体)的总遗传差异、群体内遗传差异及群体间遗传差异在总遗传差异中所占比例。

表 6　*D. virilis* 的中国各地方群体与日本东京群体(TK)的遗传差异(d_{xy})

Tab. 6　Genetic variationd (d_{xy}) between Chinese populations and Japanese Tokyo population of *D. virilis*

	QD	NJ	SH	NB	QZ	NJ*
TK**	0.003284	0.000000	0.001080	0.000000	0.001080	0.005117

** 数据来源于日本东京都立大学生物系的青塚正志。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 7 *D.virilis* 的各酿醋厂群体间的遗传差异 d_{xy} 及酿醋厂与酱油厂群体间的遗传差异

Tab. 7 Intrapopulational variation of *D. virilis* collected from soy plants and vinega plants

	酿醋厂群体(%)	酱油厂群体(%)
酿醋厂群体	0.2029	0.4359

根据文中上述一系列数据，绘出图 2 和图 3 两个示意图。

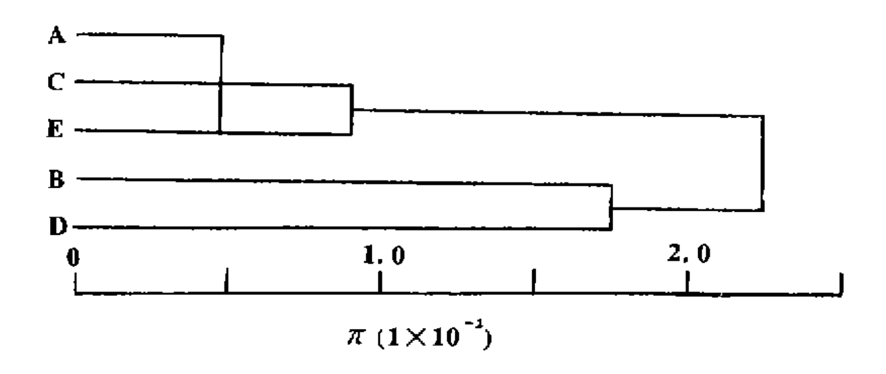


图 2 5 种酶切图谱的 mtDNA 的遗传距离示意图

Fig. 2 Diagram of genetic distance of five mtDNA genotypes

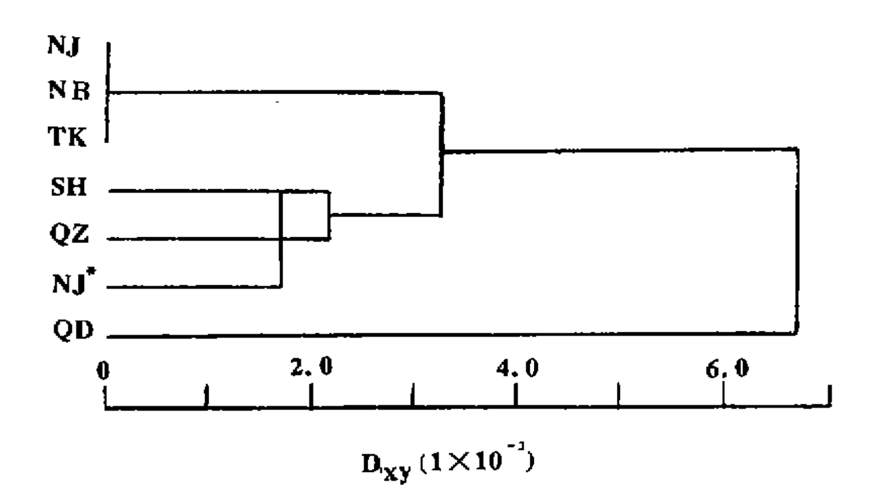


图 3 *D. virilis* 中国各地方群体及日本群体的遗传距离示意图

Fig. 3 Diagram of genetic distance of Chinese and Japanese population of *D. virilis*

3 讨论

3.1 Throchmorton 等(1983)认为，*D.virilis* 的分布范围在北纬 40° 以南，研究 *D.virilis* 进化问题的 Oba(实验室交流)估计，*D. virilis* 分布南缘约在北纬 20° 左右。根据我们从

维普资讯 http://www.cqvip.com

1983 以来历年的采集经验，在北纬 36.1° 的青岛采集到过 *D. virilis*，南方，在北纬 24.9° 的泉州、北纬 23.1° 的广州、北纬 20.05° 的海口采集到过 *D. virilis*。我们的研究结果与 Throckmorton、Oba 的推测是吻合的。

本文研究了分布在中国大陆的 5 个群体，纬度从青岛的北纬 36.1° 到泉州的北纬 24.9°，跨度为 11.2°。我们研究的群体分布广泛，接近了 *D.virilis* 的分布范围的北限与南限。

3.2 在对 5 个群体的 27 个单雌系的 mtDNA 作了 9 种限制性内切酶物理图谱分析后发现，各个群体的 mtDNA 长度上没有差异，均值为 16.00 kb，即没有插入或缺失畸变。但发现有由于碱基置换突变引起的限制性内切酶识别位点的变化(增多或减少)。由于这种变异，我们发现了 mtDNA5 种不同类型的物理图谱：A、B、C、D 和 E。A、B 存在于所分析的 5 个群体中，而 C 仅发现于青岛群体内，D、E 仅发现于南京酱油厂群体中。根据 Nei(1979)的数学模型，不同酶切图谱类型的 mtDNA 之间的遗传差异 π 为 0.46%—1.76%(见表 3)。π 表现群体内、群体间差异的程度。

3.3 由于一个群体内一般存在着若干种不同酶切图谱类型的 mtDNA，从而造成群体内遗传差异 π_{ij}。每个群体，我们研究了 5 个单雌系(南京酱油厂只得到 2 个单雌系)。5 个群体的群体内差异为 0.00%—0.33%(见表 4)。分布于中国大陆的 *D. virilis* γ_{st} 值为 24.62%(见表 4)，即中国大陆 *D. virilis* 地方群体的总的遗传差异的 24.62%系群体间的遗传差异，75.38%系群体内的差异。群体内存在着的差异可以用木村资生(Kimura，1983)的中立学说的理论解释，即 mtDNA 上的变异属不引起生存能力变化，既无益于亦无害于生物生存的突变，因而没有自然选择压力，故可以保留于同一生活环境之下。对不同群体中不同类型 mtDNA 物理图谱以不同频度的出现，可以有两种解释：其一，不同酶切图谱 mtDNA 的适应能力在不同群体中不同，从而造成了不同 mtDNA 酶切图谱类型在不同群体中的频度不同。其二，遗传漂变作用。*D. virilis* 从起源地向各地迁移，迁移到各地的原始群体的大小不同，由于基因漂变，形成不同群体中不同酶切图谱类型的频度不同。

3.4 本论文研究所得到的群体间的遗传差异 d_{xy} 为 0.00%—0.82%(见表 4)。

探讨遗传距离与地理距离之间的关系。从青岛、南京、上海、宁波与泉州 5 个群体间的遗传差异与地理距离比较中发现，在长江以南的 4 个群体：南京、上海、宁波和泉州，它们之间的遗传距离与地理距离之间无明显关系。而长江以南的 4 个群体与长江、黄河以北的青岛群体之间的遗传距离明显大于长江以南 4 个群体之间的遗传距离。这可能由于长江、黄河阻碍了 *D. virilis* 经常迁移，因而阻碍了青岛群体与江南群体之间的基因交流。我们仅在青岛群体中发现 C 型 mtDNA，在江南诸群体中均未发现，可认为是上述观点的一个佐证。类似的研究结果亦有先例。Saunder(1985)等人在研究 Horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) 的 mtDNA 差异时也发现，水域是隔断不同地理群体之间基因交流的屏障。我们的研究结果也表明地理隔离在生物进化中起着重要作用。

3.5 本研究还对酱油厂群体与醋厂群体作了比较，发现酱油厂群体与各酿醋厂群体之间的差异(见表 7)。D、E 两种酶切图谱类型的 mtDNA 仅存在于南京酱油厂群体内，而在采自酿醋厂的 5 个群体中均没有，这表明这种差异可能有适应意义，可能由不同生活环境选择的结果。不同生活环境选择作用也表现在：酱油厂群体与各酿醋厂群体的遗传差异大

维普资讯 http://www.cqvip.com

于各酿醋厂群体间的遗传差异。酱油厂与酿醋厂的生产原料、工艺、产品的不同，造成栖息其中的 *D. virilis* 生活环境的差异，如食物、温度等。而栖息于不同酿醋厂的 *D. virilis* 的生活环境虽然地理环境不同，但由于各酿醋厂的生产原料、工艺、产品类似，因而 *D. virilis* 生活环境基本相似。因此出现了地理距离很近的 NJ 和 NJ*间的遗传差异大于地理距离相差甚远的 TK 群体与现有中国大陆各酿醋厂群体间的遗传差异。

3.6 中国各地方群体与日本群体的遗传距离的比较结果(见表 6)表明，中国大陆群体与日本东京群体的 mtDNA 的遗传距离很近，没有明显差异。这一结果可能由于所研究的东京群体的单雌系太少(仅一个单雌系)，数据有较大偏差，未反映出东京群体的真实遗传状况，也可能是日本东京群体起源于中国大陆某地。东京群体 mtDNA 的酶切图谱属 A 型，而 A 型普遍存在于中国大陆的各群体中。因而做出上述推断。还可以认为，A 型具有较强的生存能力，既能适应大陆，也能适应日本的环境。日本与大陆虽有日本海相隔，但日本列岛与大陆分开却只有不长的历史，在新生代内。因此，东京群体起源于大陆的解释是有根据的。

H. Watabe 和 M. T. Toda 等(实验室交流，1989)认为，*D.virilis* 的起源地在中国，且很可能在华南地区。*D. virilis* 究竟起源于哪里，以及怎样演化成今天的分布状态?在进化学上是一个很有兴趣的问题。探明 *D. virilis* 的起源与演化问题，对解决其它果蝇种属的起源、演化也有借鉴作用，同时对解决进化学上的中立学说与综合进化论的纷争亦是有意义的。

参 考 文 献

Ferris S D *et al*, 1983. Mitochondrial DNA evolution in mice. *Genetics*, **105**: 681—721.

Kimura M, 1983. The neutral theory of molecular evolution, Cambridge, U. K.: Cambridge University Press, 34—50.

Nei M, Li W H, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci., U S. A.*, **76**(10): 5269—5273.

Nei M, Tajama F, 1981. DNA polymorphism detectedable by restriction endonucleases. *Genetics*, **97**: 145—163.

Nei M, 1982. The unfolding genome, In: Human genetics, Part A, New York: Alan R. Liss, Inc., 167—181.

Nei M, Koehn R K, 1983. Evolution of genes and proteins. Sunderland, MA, U. S. A.: Sinauer Associates, Inc., 62—88, 147—164.

Saunders N C *et al*, 1986. Genetic variation and geographic differentiation in mitochondrial DNA of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Genetics*, **112**: 613—627

Shah D M, Langley C H, 1979. Inter- and intraspecific variation in restriction maps of *Drosophila* mitochondrial DNAs. *Nature*, **281**: 696—699.

Solignac M *et al*, 1986. Mitochondrial DNA evolution in the *melanogaster* species subgroup of *Drosophila*. *J. Mol. Evol.*, **23**: 31—40.

Throckmorton L H, 1983. The genetics and biology of *Drosophila*, 3b. London: Academic Press Inc. Ltd. 227—289.

维普资讯 http://www.cqvip.com

A STUDY ON POLYMORPHISM OF MITOCHONDRIAL DNA (mtDNA) IN POPULATIONS OF *D. virilis* DISTRIBUTING IN CHINESE CONTINENT*

Jia Zhenyu** Zhu Dingliang Geng Zhencheng

(*Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai* 200433)

T. Aotsuka

(*Department of Biology, Tokyo Metropolitan University*)

Abstract

Extensive polymorphism within *D. virilis* species has been studied in this paper. We analyzed physical maps of mitochondrial DNA (mtDNA) from five populations distributing in Chinese continent using nine restriction endonucleases (*Xba* I, *Eco*R I, *Pst* I, *Hind* III, *Bgl* II, *Sac* I, *Sca* I, *Eco*RV and *Pvu* II). Five genotypes of mtDNA are found in all the five populations. The genetic difference π between the five genotypes is 0.46%–1.76%. Genetic variation within population π_{ij} is 0.00%–0.33%. Genetic variation between populations d_{xy} is 0.00%–0.82%. The γ_{st} of *D. virilis* species in Chinese continent is 24.62%. We have found the life environment of *D. virilis* has an effect on genetic variations of mtDNA, but not found the relationship between geographic distance (latitute degree) and inter-populational genetic difference (d_{xy}).

Key words *D. virilis* population, Mitochondrial DNA(mtDNA), Restriction endonuclease, Physical map, Polymorphism

* This project is supported by the fund of the Chinese Natural Science Fund Committee

** The author now is in Zhejiang Academy of Medical Sciences